

西安交通大学实验报告

成绩

课程：生物 2

实验日期：2026 年 4 月 19 日

专业班号：少年班 240

姓名：

学号：

同组者：

实验名称：质粒 DNA 的提取及其定量分析

一、实验目的

本实验旨在从大肠杆菌中提取质粒 DNA 并测定其浓度，掌握碱裂解法提取质粒的基本原理和实验技术方法，同时掌握紫外分光光度法测定核酸浓度和纯度的原理与方法。

二、实验原理

2.1 质粒与载体基本特性

质粒是独立于细菌染色体之外、能够自主复制的双链环状 DNA 分子，是基因工程中最常用的载体。理想载体应具备以下特点：具有复制起始点，可在宿主细胞中独立复制并维持稳定拷贝数；具有多克隆位点（MCS），含多种限制性核酸内切酶酶切位点，便于外源 DNA 插入；携带标记基因（如抗性基因、*LacZ* 基因），用于转化子的筛选与鉴定；对宿主细胞无害，不影响宿主正常生命活动；表达载体还应包含启动子、核糖体结合位点、终止子等表达元件，可驱动目的基因表达。本实验使用 pET-28a(+) 质粒作为实验材料。

2.2 碱裂解法提取质粒 DNA 原理

碱裂解法利用共价闭合环状质粒 DNA 与线性染色体 DNA 在拓扑结构上的差异实现分离，其核心步骤为变性、中和与纯化。首先，在裂解与变性阶段，溶液 II 中的 SDS 破坏细胞膜、裂解菌体并使蛋白质变性，NaOH 提供强碱性环境（pH>12），使线性染色体 DNA 完全变性解链，而质粒 DNA 因保持环状结构仅发生局部变性且不断裂。随后，在中和复性阶段，加入溶液 III（HAc 与 KAc 组成的高盐溶液）中和碱性，变性染色体 DNA、蛋白质与细胞碎片形成不溶性网状沉淀，而质粒 DNA 快速复性为天然环状结构，保留在上清液中。最后，采用硅胶柱离心纯化：在高盐环境下，质粒 DNA 特异性吸附于硅胶膜，经洗涤去除杂质后，用洗脱缓冲液洗脱，得到高纯度质粒 DNA。

2.3 质粒 DNA 定量与纯度分析原理

依据朗伯-比尔定律：

$$A = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{1}{T} = KCL$$

其中 A 为吸光度, K 为摩尔吸光系数, C 为浓度, L 为光程。核酸在 260 nm 处有特征吸收峰, 1 个 A_{260} 单位对应双链 DNA 浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$, 据此可测定核酸浓度。纯度判断方面, A_{260}/A_{280} 比值是主要指标: 纯 DNA 的理论比值约为 1.8, 实际可接受范围为 1.7-1.9; 比值偏低提示蛋白质或苯酚污染, 偏高则提示 RNA 污染。此外, A_{260}/A_{230} 比值大于 2.0 表明核酸较纯, 无明显的碳水化合物、多肽、苯酚或盐类等杂质干扰。本实验采用超微量蛋白核酸分析仪完成检测。

三、 实验材料

3.1 实验试剂

1. 含 pET-28a(+) 大肠杆菌菌液 (已培养好)
2. 溶液 Solution I (P1)
3. 溶液 Solution II (P2)
4. 溶液 Solution III (P3)
5. 平衡液 BL (Buffer BL)
6. 漂洗液 PW (Buffer PW, 使用前需按说明加入无水乙醇)
7. 洗脱缓冲液 EB (Elution Buffer)
8. 去蛋白液 PD (Buffer PD)
9. RNase A

3.2 实验耗材

1. 1 mL、200 μL 、10 μL 移液器 (每组各 1 套)
2. 对应规格的无菌枪头 (每组 1 套)
3. 无菌 1.5 mL EP 管
4. EP 管架
5. 吸附柱 CP3
6. 2 mL 收集管

3.3 实验仪器

1. 离心机
2. 超微量分光光度计
3. 涡旋振荡器
4. 水浴锅

四、 实验过程及现象

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μL 的平衡液 BL，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
2. 取 1.5 mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，12,000 rpm 离心 1 分钟，尽量吸除上清，重复一次，共收集 3 mL 菌体。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL 溶液 P1（含 RNase A），剧烈振荡打散菌体。
4. 向离心管中加入 250 μL 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解，室温放置不超过 5 分钟。
5. 向离心管中加入 350 μL 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000 rpm 离心 10 分钟。
6. 将上清液转移到吸附柱 CP3 中，12,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。
7. 向吸附柱 CP3 中加入 600 μL Buffer PW，12,000 rpm 离心 30-60 秒，倒掉废液，重复一次。
8. 将吸附柱 CP3 放入收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，倒掉废液以彻底去除残留乙醇。
9. 将吸附柱 CP3 置于新的干净 EP 管中，向吸附膜中间部位滴加 50-100 μL 60°C 预热的洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，12,000 rpm 离心 2 分钟，收集质粒 DNA 溶液。
10. 取少量质粒 DNA 溶液，使用超微量蛋白核酸分析仪测定浓度与纯度。

五、 实验结果

5.1 质粒 DNA 浓度与纯度测定结果

使用超微量分光光度计对提取的质粒 DNA 样品进行检测，测得质粒 DNA 浓度为 128.1 ng/ μL ， A_{260}/A_{280} 比值为 2.01， A_{260}/A_{230} 比值为 2.83。

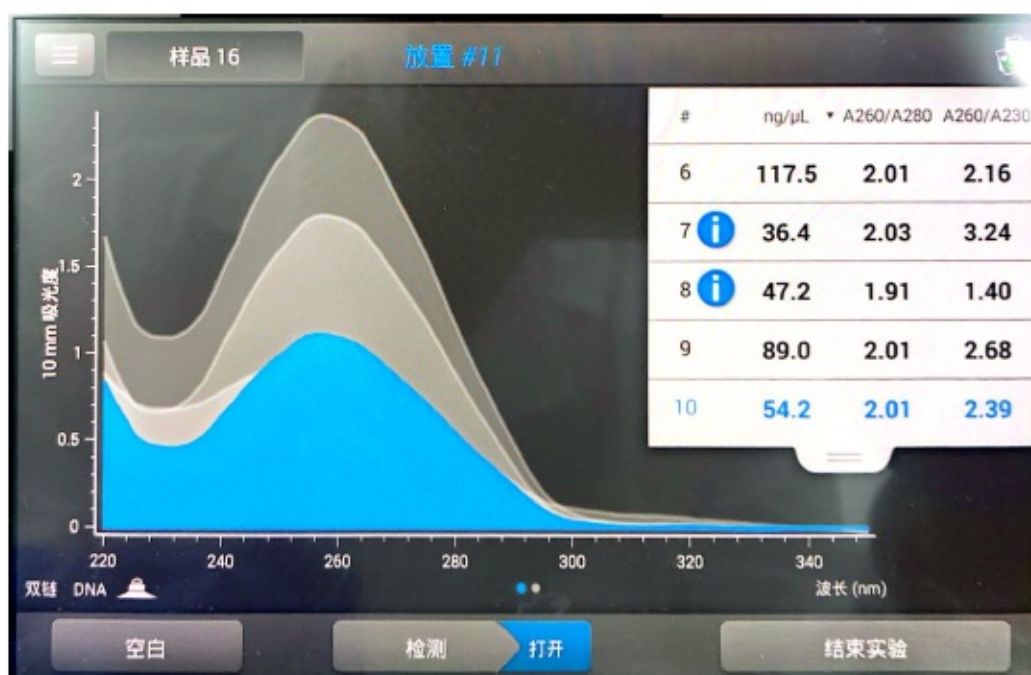


图 1: 质粒 DNA 吸光度

5.2 结果分析

本次实验提取的质粒 DNA 浓度为 $128.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，明显高于常规参考范围 ($20\text{--}40 \text{ ng}/\mu\text{L}$)，说明提取效率良好。可能的原因包括：菌液收集充分 (3 mL)、操作过程中震荡混匀得当、吸附柱纯化步骤规范、洗脱缓冲液预热 (60°C) 有效提高了洗脱效率。

在纯度方面，纯 DNA 的理论 A_{260}/A_{280} 比值约为 1.8，本实验测得 2.01，略高于理论值。该结果表明样品中无明显蛋白质污染（偏低才提示蛋白污染），但可能存在微量 RNA 残留导致比值轻微偏高，这是因为 RNA 在 260 nm 处亦有强吸收。由于实验使用了 RNase A 处理，RNA 残留量通常较低，该比值满足后续实验需求。 A_{260}/A_{230} 比值为 2.83，显著高于 2.0 的纯度阈值，表明提取液中无明显的碳水化合物、多肽、苯酚或盐类等杂质干扰。综合来看，所提取的质粒 DNA 浓度高、纯度好，适用于后续酶切及 PCR 等分子生物学实验。

六、 讨论与思考题

若实验中测得浓度偏低或纯度较差，可能由以下原因引起：一是起始菌量不足或菌液离心不彻底导致质粒总量偏少；二是裂解不充分（存在未打散的菌块）或裂解时间过长破坏了质粒结构；三是加入溶液 P3 后未立即混匀，产生局部沉淀，影响复性分离效果；四是洗脱步骤中 EB 体积过小、pH 偏低（低于 7.0），或未提前在 $65\text{--}70^\circ\text{C}$ 水浴预热，导致洗脱效率下降。纯度较差则可能是由于吸附柱中残留了含乙醇的漂洗液（PW），或操作中混入了蛋白质及去污剂杂质。

西安交通大学实验报告

成绩	
----	--

课程：生物 2

实验日期：2026 年 4 月 19 日

专业班号：少年班 240

姓名：

学号：

同组者：

实验名称：质粒酶切

一、实验目的

将实验五中提取的质粒 DNA 进行单酶切并电泳鉴定，掌握 DNA 酶切的原理和方法。

二、实验原理

核酸内切酶能够水解并切断核苷酸链的磷酸二酯键。其中，II 型限制性核酸内切酶具有严格的序列依赖性，能够特异性识别核苷酸序列并在识别序列内的特定位点进行切割，是基因工程中的重要工具酶。本实验采用质粒单酶切方法，对实验五中提取的 pET-28a(+) 质粒进行切割。完整的质粒在细胞内呈共价闭合的超螺旋结构，当使用限制性核酸内切酶（如 BamHI 或 HindIII）进行单酶切后，磷酸二酯键被切断，质粒的空间构型从超螺旋或松弛开环转变为线状（Linear）DNA 分子。pET-28a(+) 质粒全长为 5369 bp。

三、实验材料与操作步骤

3.1 实验材料与试剂

- 实验五提取的质粒 DNA（约 1 μ g）
- 限制性内切酶 BamHI 或 Hind III
- 配套的 10 $\times$ K Buffer 或 10 $\times$ M Buffer
- 灭菌水

3.2 酶切体系配制与反应条件

取 PCR 管做好标记，在冰盒上按以下顺序配制 20 μ L 的单酶切体系：灭菌水 11 μ L，10 $\times$ Buffer 2 μ L，质粒 DNA 6 μ L，限制性内切酶 1 μ L。各组分加完混匀后，离心将液滴甩至管底，置于 PCR 仪中，于 37 $^{\circ}$ C 保温孵育 1 小时。

四、 结果分析与思考题

结合电泳结果图对酶切产物进行分析。在电泳图中，未酶切的质粒样品呈现两条带：迁移速率较快的下方亮带为超螺旋构型（Supercoiled, SC），迁移速率较慢的上方暗带为松弛开环构型（Open Circular, OC），这是质粒提取过程中少量单链断裂释放超螺旋应力所致。单酶切产物泳道则仅呈现一条极其明亮、锐利的单一条带，其电泳迁移位置恰好介于未酶切质粒的超螺旋带和开环带之间。在整个泳道中未观察到残留的超螺旋带或开环带，表明质粒已基本被限制性内切酶完全切割。

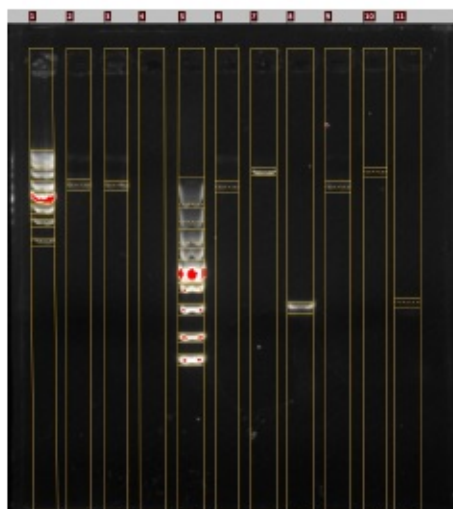


图 1: 电泳结果图，其中 lane9 为质粒，lane10 为酶切产物

基于 GelAnalyzer 图像分析软件对凝胶电泳荧光信号的精确提取与定标测算，Lane 9（未酶切质粒）的主带表观分子量为 7452 bp，而 Lane 10（单酶切产物）的主带分子量被精确定量为 10965 bp。针对本实验结果，综合判定质粒酶切反应极其完全。Lane 10 泳道中仅呈现出单一、纯粹且边缘锐利的滞后条带，同时 Lane 9 中原有跑得较快的质粒特征带（7452 bp 位置）在经过酶切处理后消失，无任何微弱背景残留，共价闭合环状质粒基本上均已被限制性核酸内切酶切断。

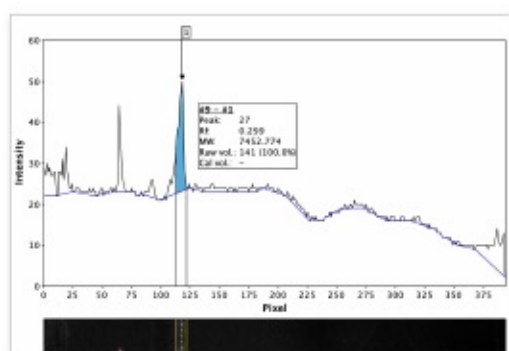


图 2: 质粒结果

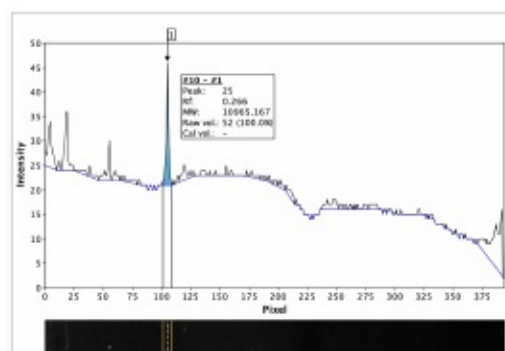


图 3: 单酶切结果

西安交通大学实验报告

成绩	
----	--

课程：生物 2

实验日期：2026 年 4 月 25 日

专业班号：少年班 240

姓名：

学号：

同组者：

实验名称：聚合酶链式反应

一、实验目的

利用 PCR 技术扩增目的基因序列，掌握 PCR 技术的原理和操作方法。

二、实验原理

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是一种特异性体外扩增 DNA 的方法，本质上是 DNA 的体外半保留复制。其主要反应成分包括 DNA 模板、上下游寡核苷酸引物、dNTPs 原料、耐高温的 DNA 聚合酶 (如 Taq 酶) 以及提供适宜 Mg^{2+} 浓度和 pH 环境的缓冲液。反应过程包含三个基本步骤的往复循环：第一步，高温变性 (通常为 $94^{\circ}C$)，使双链 DNA 模板的氢键断裂，解离成两条单链；第二步，低温退火 (如 $55^{\circ}C$)，引物根据碱基互补配对原则特异性结合到单链 DNA 模板的靶序列上；第三步，适温延伸 (通常为 $72^{\circ}C$)，DNA 聚合酶沿 5' 到 3' 方向催化 dNTP 的添加，合成新的互补链。每经过一轮循环，目的 DNA 片段数量理论上增加一倍，经过 25 至 30 轮循环后，目的 DNA 片段可被呈指数级扩增达数百万倍。

三、实验材料与操作步骤

3.1 实验材料与试剂

- 模板 DNA (λ DNA, $1 \mu g/mL$)
- 上游引物 P1 (5'-GATGAGTTTCGTGTCCGTACAAC-3', $20 \mu M$)
- 下游引物 P3 (5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3', $20 \mu M$)
- dNTP Mixture ($2.5 mM$)
- Taq 酶 ($5 U/\mu L$)
- $5\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+})
- 灭菌水

3.2 反应体系配制与扩增程序

取 PCR 管，按以下顺序配制 50 μL 的反应体系：灭菌水 28.5 μL ，5 $\times$ PCR Buffer 10 μL ，模板 DNA 1 μL ，P1 引物 1 μL ，P3 引物 1 μL ，dNTP Mixture 8 μL ，Taq 酶 0.5 μL 。各组分加完后混匀，离心将液滴甩至管底，放入 PCR 仪。设置扩增程序为：预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 分钟；随后进入 25 个循环（变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒，退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒，延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒）；循环结束后最终延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟；最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

四、 思考问题与结果分析

关于 1 个模板 DNA 分子经过 25 个 PCR 循环后的理论产量：PCR 扩增呈指数型增长，理想状态下每一个循环 DNA 分子数目翻倍。起始为 1 个双链模板 DNA 分子，经历 25 个循环后，理论上 DNA 链的总对数达到 2^{25} 个，即 33,554,432 个。扣除少量引物末端未限定长度的长片段副产物后，两端被引物准确限定的特异性目的 DNA 片段数量约为 $2^{25} - 2 \times 25$ 个，在宏观数量级上绝大多数产物均为目的片段。

西安交通大学实验报告

成绩	
----	--

课程：生物 2

实验日期：2026 年 4 月 25 日

专业班号：少年班 240

姓名：[REDACTED]

学号：[REDACTED]

同组者：[REDACTED]

实验名称：琼脂糖凝胶电泳

一、实验目的

掌握琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 的原理和方法，对质粒提取产物、酶切产物及 PCR 扩增产物进行分离鉴定。

二、实验原理

电泳是利用带电粒子在电场中移动速度不同而达到分离目的的技术。在中性环境下，核酸分子的磷酸基团解离而使其带负电，因此在电场作用下会向正极移动。对于 DNA 分子而言，其电荷密度基本相似，在凝胶中的泳动速率主要由分子量大小和分子构型决定，泳动速率通常与分子量的对数成反比。对于质粒 DNA，不同构型的迁移率存在显著差异：超螺旋构型（SC）最为致密，受到凝胶网状结构的阻力最小，迁移速率最快；线状 DNA（L）居中；松弛开环构型（OC）空间体积最大，阻力最大，迁移速率最慢。通过在凝胶中加入核酸染料（如 Gel Red），利用紫外激发荧光即可对 DNA 条带进行显像，判断其大小和相对含量。

三、实验材料与操作步骤

3.1 实验材料与耗材

- 质粒提取产物、酶切产物、PCR 扩增产物
- 琼脂糖
- 0.5× TBE 电泳缓冲液
- 6× Loading Buffer
- DNA Marker: DL5000 DNA Marker、Supercoiled DNA Marker
- EB 替代物（Gel Red）染料

3.2 操作流程

1. **制胶：**称取 0.32 g 琼脂糖，加入 40 mL 0.5× TBE 缓冲液（终浓度 0.8%），在微波炉中加热至完全熔化。冷却至约 50–60°C 时加入 4 μ L Gel Red 并充分混匀，倒入已安装好梳子的胶槽中，室温静置待其完全凝固后小心拔出梳子。
2. **样品制备：**取质粒 DNA 和酶切产物各 7.5 μ L，分别加入 1.5 μ L 6× Loading Buffer 混匀（共 9 μ L）；取 PCR 产物 5 μ L，加入 1 μ L 6× Loading Buffer 混匀（共 6 μ L）。
3. **上样与电泳：**将制备好的样品及 DNA Marker 依次小心加入凝胶上样孔中。接通电源，在 140 V 电压下恒压电泳 30–40 分钟。
4. **观察与成像：**电泳结束后取出凝胶，置于凝胶成像仪中，在紫外光下观察 DNA 条带并拍照保存图像。

四、 电泳结果分析与综合讨论

结合电泳图像，对凝胶上各泳道的结果进行逐一分析。整块凝胶背景干净清晰，无弥散的荧光涂抹现象（Smear），表明样品中无明显的核酸降解或基因组 DNA 污染；各泳道底部均未出现弥散的低分子量亮斑，说明 PCR 体系中不存在引物二聚体的大量积累。

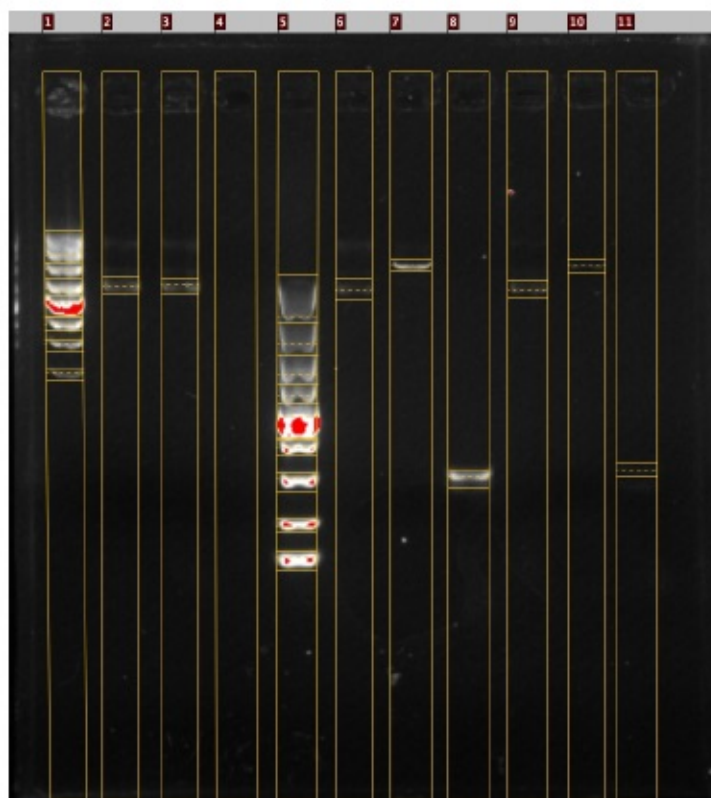
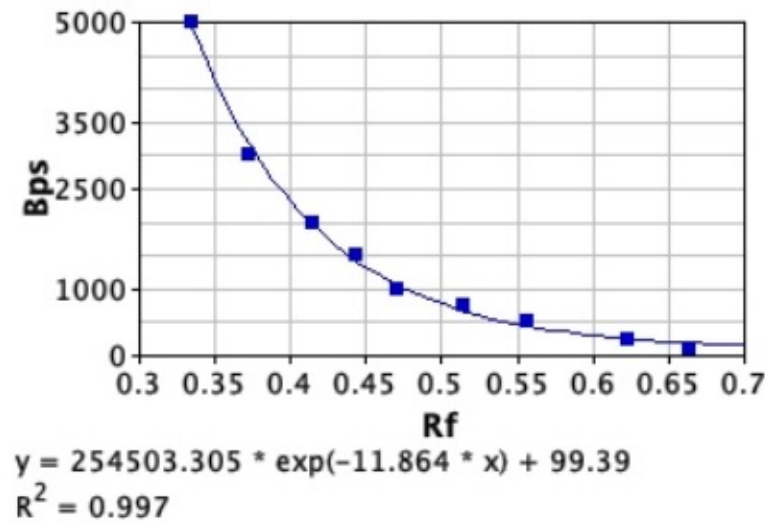


图 1: 电泳结果图

其中本组实验为泳道 9, 10, 11 三道。样品分别为：制取的质粒 DNA(lane 9)，酶切产物 (lane 10)，PCR 产物 (lane 11) Supercoiled DNA Marker(lane 1) DL5000 DNA Marker(lane 5)

本实验采用琼脂糖凝胶电泳对未酶切质粒、质粒单酶切产物及 PCR 扩增产物进行了分离与表征，并结合 GelAnalyzer 图像分析软件进行了定量测算。经紫外凝胶成像系统观察，整体电泳背景清晰，各样品泳道无明显拖尾（Smear）及引物二聚体残留，表明核酸样品未发生非特异性降解且实验体系纯净度较高。

软件基于 DL5000 DNA Marker 成功构建了相对迁移率（ Rf ）与分子量大小（bp）的拟合模型，该标准曲线呈现严密的指数衰减物理特征（方程为 $y = 254503.305 \cdot e^{-11.864x} + 99.39$ ），且决定系数 R^2 高达 0.997，证明本次电泳场强分布均一，基准参考体系具有极高的可靠性。



基于此，Lane 11（PCR 产物）的有效峰被精确提取于 $Rf = 0.544$ 处，对应计算分子量约为 498.6 bp，这与特异性扩增目的片段的理论预期高度吻合。Lane 9（未酶切质粒）的主带表观分子量为 7452 bp，而 Lane 10（单酶切产物）的主带分子量定量为 10965 bp。

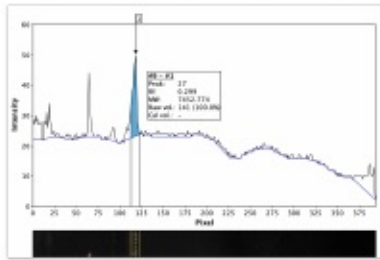


图 2: 质粒

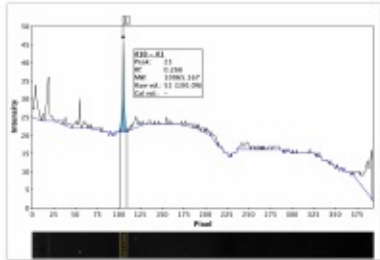


图 3: 酶切

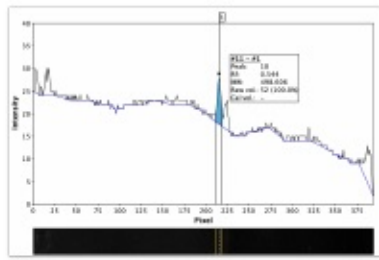


图 4: PCR

分析数据如下表：

表 1: 凝胶电泳条带分析结果

Lane	Band	Label	Peak value	Peak Rf	MW	Raw volume	Volume ratio (%)	Cal. volume
9	1	质粒	27	0.299	7452.774	141	100	—
10	1	酶切	25	0.266	10965.167	52	100	—
11	1	PCR	10	0.544	498.606	52	100	—